

羊膜预防椎板切除术后硬膜外粘连的实验研究

朱勋兵, 周建生, 潘功平, 肖玉周

[摘要]目的: 探讨羊膜在预防椎板切除术后硬膜外粘连的作用及可能机制。方法: 对 60 只中国白兔行 L₅ 水平椎板切除术后, 据术前随机分组, 分别在硬膜外覆盖羊膜(羊膜组)、几丁糖膜(几丁糖膜组), 空白对照组不做任何覆盖。术后 2、4、8、12 周每组分别处死 5 只动物, 通过双盲法对所取标本做组织学观察及计算机辅助图像分析。结果: 空白对照组暴露的硬膜发生广泛粘连, 硬膜外腔几乎消失; 羊膜组和几丁糖膜组硬膜外瘢痕稀少, 硬膜表面光滑, 硬膜外形成潜在腔隙, 维持了硬膜外的有效空间。不同时间段三组间粘连度评价以羊膜组最低, 几丁糖膜组次之, 空白组最高, 差异均有显著性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。结论: 在硬膜和骶棘肌间放置合适的材料可预防硬膜外粘连; 羊膜能预防硬膜外瘢痕向椎管内延伸, 是一种有效预防硬膜外粘连的生物相容性材料。

[关键词] 椎板切除术; 粘连; 羊膜; 几丁糖膜

[中国图书资料分类号] R 681.5 R 619.9 [文献标识码] A

Experimental study on prevention of postlaminectomy adhesions with amnion

ZHU Xunbing ZHOU Jiansheng PAN Gongping XIAO Yuzhou

(Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of amniotic membrane in the prevention of epidural adhesion after laminectomy and to find out the related mechanism. **Methods** Laminectomy was performed in the lambar 5 sector of 60 rabbits and the exposed dura mater was covered with amniotic membrane (group AM), chitosan membrane (group CHS), and no covering in the control group (group CON) respectively. Five animals in each group were sacrificed at 2, 4, 8, 12 weeks postoperatively. By using a double blind protocol the specimens were prepared for histological study and computer assisted image analysis. **Results** In the control group the adhesion of the dura mater to the scar tissue occurred to the entire exposed surface and the extradural space almost disappeared. In group AM and CHS the formation of epidural scar was much less than that in the control group. The dura mater was smooth and a gap had formed in the epidural cavity. The epidural space was well preserved. Group AM had the lowest adhesion evaluation index and there was statistical difference ($P < 0.05 \sim P < 0.01$). **Conclusion** Putting a suitable obstructer between the dura mater and the erector spinal muscle can prevent the extension of epidural scar into the spinal canal and make dura exempted from adhesion. Amniotic membrane is an effective biocompatible material in preventing epidural scar.

[Key words] laminectomy; adhesions; amnion; chitosan membrane

硬膜外粘连是因椎管手术后硬膜外脂肪由纤维组织替代, 导致硬膜及神经根与周围结构的粘连^[1]。尽管骨科手术技术已有很大的进步, 但硬膜外粘连仍是椎管手术后常见的并发症, 这个问题一直是骨科领域非常重视的课题, 探索积极有效的预防硬膜外粘连的材料仍然是亟待解决的难题。羊膜作为一种低抗原性生物材料, 具有抗炎、抗感染和抗粘连特性, 不仅可用作生物敷料, 还可用来桥接神经、修补组织和预防粘连^[2,3]。本文拟探讨羊膜在预防椎管粘连中的作用, 了解硬膜外瘢痕形成与硬膜和神经根的关系, 为椎管手术后硬膜外瘢痕粘连防治提供行之有效的方法和材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料准备

1.1.1 羊膜的制备 取即将分娩或预产期前 1~2 天之孕兔羊膜, 用无菌生理盐水冲洗尽血渍后, 置于含青霉素 5×10^4 u/L 链霉素 1×10^4 u/L 二性霉素 2.5 mg/L 的 DMEM 培养液中 (Gibco 公司), 放 4℃ 冰箱冷藏待用^[4]。使用时将羊膜无张力地平铺于无菌纸片上, 羊膜光滑面朝上, 修剪成比所需面积略大的羊膜片, 放无菌生理盐水中漂一下即可使用。

1.1.2 几丁糖膜的制备 系由几丁糖凝胶碱化后涂布在玻片上干燥后制成的膜状物, 厚约 0.3~0.5 mm, 质软有韧性。

1.2 实验动物与分组 成年中国白兔 60 只, 体重 2.0~3.0 kg 雌雄不拘。依据椎板缺损处硬膜外覆盖物的不同, 将 60 只白兔随机分为羊膜组 (AM 组)、几丁糖膜组 (CHS 组) 和空白对照组 (CON

[收稿日期] 2005-05-17

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院 骨科, 安徽 蚌埠 2330004

[作者简介] 朱勋兵 (1974-), 男, 博士研究生, 现在上海市伤骨科研究所、瑞金医院骨科。

组), 每组 20 只。

1.3 动物造模 无菌操作下取后正中切口长约 20 mm, 逐层切开, 剪去 L₅ 棘突, 用微型椎板咬骨钳咬除 L₅ 椎板, 造成 10 mm × 5 mm 的硬脊膜裸露区, 去除硬膜外脂肪。彻底止血后, 根据术前随机分组, 在硬膜外分别覆盖羊膜和几丁糖膜, 无任何间置物覆盖组作为空白对照组。所有动物术后同等条件下分笼饲养, 不服任何药物。

1.4 观察内容和方法

1.4.1 标本收集处理 各组分别于术后 2、4、8、12 周时各处死 5 只, 动物处死后完整取出包括骶棘肌及椎体附件在内的 L₅ 段脊柱, 福尔马林溶液固定后行石蜡包埋切片, 厚度 5 μm。分别对组织切片行 HE、Masson 和苦味酸-天狼猩红染色。

1.4.2 光学显微镜观察 在普通光学显微镜下观察硬膜外瘢痕分布及与硬膜和神经根的关系; 偏振光显微镜下定性观察 I、II 型胶原的分布及比例, 并与 HE 片中的可疑胶原进行对比判断。

1.4.3 计算机图像分析 (Axio-plan 2 image 美国) 计算出不规则形态的瘢痕横切面面积, 将其与椎管面积的比值作瘢痕指数测定。

1.4.4 透射电镜 (Hitachi H-500 型, 日本日立公司) 观察瘢痕中成纤维细胞及基质形态。

1.5 统计学分析 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 普通显微镜观察 术后 2 周空白组硬膜外有大量的肉芽组织填充缺损, 由背侧向椎管侧方延伸, 有的达神经根部 (见图 1)。几丁糖膜组和羊膜组肉芽组织和成纤维细胞增生不活跃, 羊膜片基质及基底膜肿胀疏松, 有少许成纤维细胞和炎性细胞浸润。术后 4 周空白组胶原纤维增多, 部分成纤维细胞转化为纤维细胞, 毛细血管减少, 几丁糖膜组和羊膜组成纤维细胞较少, 胶原纤维稀少, 硬膜外间隙存在。羊膜与其后方纤维组织相融合, 结构模糊, 与硬膜间无粘连; 胶原密度低, 无明显炎症反应 (见图 2)。8 周时肉芽组织纤维化, 空白组胶原致密, 硬膜与瘢痕粘连, 并见骨组织在原椎板缺损处形成, 它与硬膜间有瘢痕存在。几丁糖膜组胶原密度低, 无明显炎症反应; 硬膜外瘢痕少, 与硬膜无粘连; 几丁糖膜降解成红染无结构小碎片 (见图 3)。术后 12 周时空白组可见大量胶原纤维, 排列紧密紊乱; 细胞成分基本消失, 硬膜与瘢痕粘连致密, 并与新生椎板相连。羊膜组术后 8 周及 12 周, 瘢痕面积缩小, 细胞成分稀少, 新生骨板下硬膜表面无粘连, 部分标本有硬膜外脂肪再生, 羊膜片被胶原取代 (见图 4)。

2.2 椎管内相对瘢痕指数 微机图像处理系统计算侵入椎管内瘢痕面积与整个椎管面积的比值, 测量 3 张切片, 取其均值。2 周内椎板缺损处修复以肉芽组织形成为主, 胶原纤维较少, 瘢痕指数差异不显著 ($P > 0.05$)。4 周时胶原纤维增多, 瘢痕初步形成, 羊膜组数值最小, 显示了羊膜预防粘连作用 ($P < 0.01$)。8 周时几丁糖膜逐步膨胀为凝胶, 发挥其预防粘连特性, 但仍较羊膜组差 ($P < 0.01$)。12 周时羊膜组和几丁糖膜组瘢痕指数都较空白组小 ($P < 0.01$), 但两组间差异有显著性 ($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 三组标本术后不同时间相对瘢痕指数比较 ($n_i = 5$, $\bar{x} \pm s$, %)

分组	2周	4周	8周	12周
CON	3.95 ± 0.78	8.61 ± 0.83	14.91 ± 0.73	12.77 ± 0.97
CHS	3.23 ± 0.69	7.92 ± 0.69	10.76 ± 0.98**	8.58 ± 0.89**
AM	3.01 ± 0.55	5.23 ± 0.48 ^{△△}	7.35 ± 0.85 ^{△△}	6.90 ± 0.82 ^{△△} *
<i>F</i>	2.61	34.29	97.04	56.99
<i>P</i>	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01
<i>M_S</i> 组内	0.462	0.465	0.739	0.802

q 检验: 与 CON 组比较 ** $P < 0.01$; 与 CHS 组比较 $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 胶原纤维偏振光显微镜下观察 2 周、4 周时瘢痕中主要为纤细弱折射光的 II 型胶原纤维填充椎板缺损处, 呈绿色。空白组显示硬膜与后方胶原组织相粘连 (见图 5)。羊膜组和几丁糖膜组硬膜外腔存在, 有稀疏胶原偏光。术后 8 周、12 周时新骨形成部位和硬膜后方成熟瘢痕中胶原以呈黄色和红色粗大强双折射光的 I 型胶原为主。空白组胶原多而密, 与硬膜相连, 部分延至椎管侧方, 包裹住神经根 (见图 6)。羊膜组椎管后方胶原纤维少而稀疏, 硬膜外腔存在, 硬膜与后方瘢痕组织无粘连。几丁糖膜组基本同羊膜组, 硬膜外腔存在, 硬膜稍增厚。

2.4 透射电镜观察 术后 2 周时空白组成纤维细胞数量多, 核大, 椭圆形, 胞质丰富, 线粒体数目较多, 显示活跃的代谢和分泌功能; 细胞周围有少许胶原纤维出现。羊膜组成纤维细胞数目较少, 胞内线粒体少, 基质浅淡, 细胞发育较对照组差 (见图 7)。几丁糖膜组与羊膜组所见相似。8 周时观察, 各组成纤维细胞基本变为纤维细胞, 核浓缩, 染色深, 胞质及细胞器减少。空白组胶原多而密, 排列紊乱; 羊膜组胶原稀疏 (见图 8); 几丁糖膜组胶原量居两者之间。12 周时各组情况基本同 8 周, 胶原变得更加致密, 瘢痕组织成熟。

3 讨论

3.1 椎板切除术后硬膜外粘连的发生及预防 LaRocca 等^[5]首次提出“椎板切除膜”(laminaectomy

membrane)的概念,指出瘢痕主要来源于后方损伤的骶棘肌的粗糙面和手术剥离椎板处骨膜纤维层。本实验发现椎板切除膜是脊柱后方部分组织去除后纤维化瘢痕组织的特征性表现,它起源于椎旁肌肉下并侵犯到硬膜外腔;没有置入膜的情况下,瘢痕组织就与暴露的硬膜粘连,包绕神经根,并与暴露的椎间盘相连,这些是症状复发和手术失败的原因。

本实验结果显示,当硬膜外放置羊膜或几丁糖膜时硬膜外间隙未见明显瘢痕粘连;如无覆盖物则瘢痕粘连多而紧密。实验中椎板切除未累及椎管前方及侧方,结果发现硬膜外纤维化的形成与粘连主要来源于椎管后方的创伤、水肿和纤维母细胞的增殖;外源的屏障材料可阻挡硬膜后方的粘连形成。

3.2 羊膜预防椎管粘连的可能机制

3.2.1 羊膜的理化及生物特性 羊膜是胎膜最内层的一层薄的半透明的组织,由羊膜上皮细胞和其下基底膜组成,厚约 0.2~0.5 mm,附着于绒毛膜最内面,无血管神经或淋巴管分布,为光滑柔韧的半透膜^[6]。抗原性甚微,有实验发现羊膜表面并无 HLA-A、B、C、DR 及 β_2 微球蛋白^[7],不影响组织的修复和切口的愈合;相反,正因为这种轻微的排斥反应,使羊膜随着时间的延长将逐渐被排斥吸收,是一种较为理想的移植材料。本实验也发现羊膜组切口愈合正常,炎性细胞侵入量很少,各个时期均无明显炎症反应,说明羊膜有着极好的生物相容性和极低的免疫原性。电镜检查发现羊膜组硬膜外瘢痕中成纤维细胞增生不明显,功能不如对照组活跃。我们认为这些可能和羊膜的理化性质及生物学特性有关,部分解释了羊膜预防椎管粘连的机制。

3.2.2 羊膜的屏障作用 羊膜将椎板缺损部位完全封闭,把水肿和骶棘肌与硬膜有效地隔开,起着一种屏障作用,能阻止成纤维细胞向硬膜方向渗出,减少了椎管内瘢痕形成的量;而且光滑面和硬膜相对,允许硬膜和神经根的移动,减少了二次手术的分困难。羊膜还起着生物支架作用,使成纤维细胞在其背面生长;随着创伤修复,后期羊膜被纤维细胞爬行替代,其背侧的瘢痕组织即成自然屏障,但硬膜面光滑无粘连;从而维持了硬膜外的有效空间,防止了硬膜外的粘连和压迫。

3.2.3 羊膜有抗感染、抗炎特性 羊膜移植术后发生感染的危险性很小。Quinby等^[8]认为羊膜中含有尿囊素与溶菌酶,能使创面细菌量减少。穆学夏等^[9]发现牛羊膜的孔隙为 0.5~4.0 μm ,而小于 4.0 μm 的孔隙细菌一般不易穿过。羊膜通过抑制感染和炎症反应,减弱炎性介质的释放,从而降低了椎管内瘢痕形成和硬膜外粘连的发生。

3.2.4 羊膜抗粘连特性 已有学者^[10]证实羊膜有很强的抗粘连作用。Li等^[11]考虑羊膜上皮细胞和基质间通过细胞因子产生的相互作用可能抑制了纤维组织的形成。Tseng等^[12]通过培养的人角膜细胞实验显示,羊膜能通过改变 TGF- β 蛋白和受体的表达来降低瘢痕粘连。基于下调 TGF- β 信号系统降低瘢痕粘连的原理,Shah等^[13]发现在切口周围注射中和 TGF- β 的抗体时能有效地抑制瘢痕形成。

我们体会到手术创伤所致的炎性渗出和水肿的存在与瘢痕粘连的形成有关,故有限无创操作、彻底止血是预防椎管术后硬膜外粘连的基础;硬膜外覆盖物要与椎板切除缘良好相贴,以阻止成纤维细胞的进入,亦有助于减少瘢痕形成。对不同方法保存的羊膜预防硬膜外粘连的作用和机制探讨及羊膜植入后的代谢吸收特点尚需深入研究。

(本文图 1~8 见封四)

[参 考 文 献]

- [1] Songer MN, Ghosh I, Spencer DL. Effects of sodium hyaluronate on peridural fibrosis after lumbar laminotomy and discectomy [J]. *Spine* 1990; 15(6): 550-554
- [2] 陈有刚, 朱家恺. 人羊膜基底膜桥接神经缺损实验研究 [J]. *中华显微外科杂志*, 1990; 13(1): 20-24
- [3] Zachariou Z. Amniotic membranes as prosthetic material [J]. *J Pediatr Surg*, 1997; 32(10): 1458-1463
- [4] 陈家祺, 周世有, 黄挺, 等. 新鲜羊膜移植治疗严重的急性炎症期及瘢痕期眼表疾病的临床研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2000; 36(1): 13-18
- [5] LaRocca H, Macnab I. The laminectomy membrane [J]. *J Bone Joint Surg Br* 1974; 56B(3): 545-550
- [6] 张振钧. 羊膜的生理结构与功能 [J]. *实用妇科与产科杂志*, 1989; 5(2): 69
- [7] Akei CA, Adinolfi M, Welsh KJ et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation in volunteers [J]. *Lancet* 1981; 2(8254): 1003-1005
- [8] Quinby WC Jr, Hoover HG, Scheffan M, et al. Clinical trials of amniotic membranes in burn wound care [J]. *Plast Reconstr Surg* 1982; 70(6): 711-717
- [9] 穆学夏, 许丰勋, 刘玉亮, 等. 戊二醛储存羊膜在烧伤创面的应用 [J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1989; 2(3): 265-282
- [10] van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, et al. Endometrial cell adhesion in an *in vitro* model using intact amniotic membranes [J]. *Fertil Steril* 1996; 65(1): 76-80
- [11] Li DQ, Tseng SC. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial fibroblast interactions of human ocular surface [J]. *J Cell Physiol* 1995; 163(1): 61-79
- [12] Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms TGF- β receptor type II and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix [J]. *J Cell Physiol* 1999; 179(3): 325-335
- [13] Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta [J]. *Lancet* 1992; 339(8787): 213-214

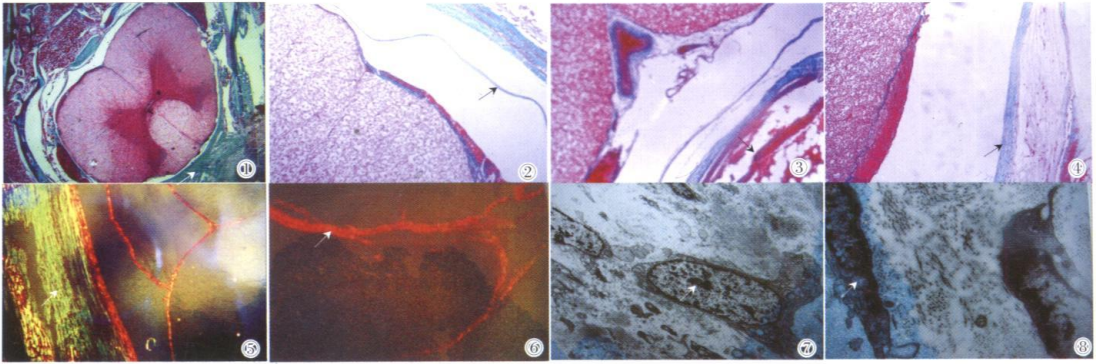


图1 空白组术后2周,纤维肉芽组织填充椎板缺损,与硬膜紧密相连,向椎管侧方延伸(Masson染色 ×20) 图2 羊膜组术后4周,羊膜与后方纤维组织融合,羊膜靠硬膜面光滑,硬膜外腔清晰(Masson染色 ×100) 图3 几丁糖膜组术后8周,几丁糖膜部分降解成碎片状隔开硬膜与椎板,硬膜稍增厚(Masson染色 ×100) 图4 羊膜组术后12周,硬膜外腔新生脂肪硬膜稍厚(Masson染色 ×100) 图5 空白组术后2周,硬膜后纤维的弱胶原偏光与硬膜紧密相贴(苦味酸-天狼腥红染色 ×100) 图6 空白组术后12周,粘连包绕神经根,呈黄红色粗大强双折射光(苦味酸-天狼腥红染色 ×100) 图7 羊膜组术后2周,成纤维细胞发育差,胞质少,基质浅淡,内质网变性(电镜 ×3 000) 图8 羊膜组术后8周,成纤维细胞基本变为纤维细胞,核浓缩,胞周胶原稀疏(电镜 ×10 000)

皮肤 Merkel 细胞癌 3 例报道及文献复习(正文见 164 页)

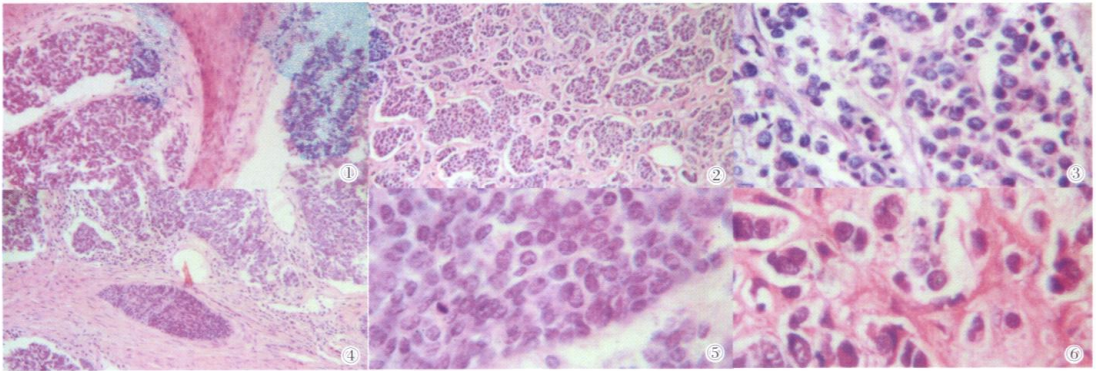


图1 肿瘤位于真皮,与表皮间有一无细胞浸润带 图2 瘤细胞呈团块状、巢状分布 图3 瘤细胞大小、形态较一致 图4 瘤细胞呈圆形或椭圆形,胞质少 图5 核染色质呈细颗粒状、粉尘状 图6 基底细胞癌样区域

蚌埠医学院学报

双月刊(1976年3月创刊)
2006年 第31卷 第2期(总第140期)
2006年3月15日出版

主管单位:安徽省教育厅
主办单位:蚌埠医学院
主 编:祝 延
编辑出版:蚌埠医学院学报编辑部
(安徽省蚌埠市东海大道2600号 233030)
电话:(0552)3175456

电子信箱:bang@chinajournal.net.cn
印 刷:蚌埠市光大彩色制印有限公司
国内订阅:全国各地邮政局
国内总发行:蚌埠市邮政局
国外总发行:中国国际图书贸易总公司
(北京399信箱)

Journal of Bengbu Medical College

Bimonthly (Founded in March 1976)
2006, Vol. 31, No. 2 (Sum 140)
March 15, 2006

Responsible Institution The Education Department of Anhui Province
Sponsored by Bengbu Medical College
Editor in Chief ZHU Yan
Edited and Published by The Editorial Board of Journal of
Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China
Tel: (0552)3175456

E-mail bang@chinajournal.net.cn
Printed by Bengbu Guangda Color Printing Co. Ltd
Domestic Subscription Local Post Offices
Domestic Distribution Bengbu Post Office
Foreign Distribution China International Book Trading Corporation
(P. O. Box 399, Beijing, China)